低温驯化后水椰八角铁甲生理活性物质含量的变化

华瑞香, 侯有明*, 石章红

(福建农林大学植物保护学院,福建省昆虫生态重点实验室,农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室,福州 350002)

摘要:【目的】分析低温驯化后水椰八角铁甲 *Octodonta nipae* 体内各种生理活性物质含量的变化,为揭示水椰八角铁甲耐寒机制提供理论基础。【方法】以 25℃处理为对照,将水椰八角铁甲各虫态于 12.5, 15, 17.5 和 20℃驯化处理 10 d 后,比较其体内的游离水、蛋白质、氨基酸、粗脂肪、甘油和可溶性糖原等生理活性物质含量的变化。【结果】低温驯化显著影响铁甲体内上述物质的含量水平。低温驯化能提高该铁甲体内甘油和游离氨基酸的含量,降低游离水、蛋白质、粗脂肪、可溶性糖原的含量。与对照相比,12.5℃驯化对该铁甲各虫态体内游离水含量存在显著影响($P<0.01$);经 12.5,15.0,17.5 和 20.0℃驯化后,该铁甲各虫态体内蛋白质、粗脂肪含量与对照相比均存在显著差异($P<0.01$);经 12.5,15.0 和 17.5℃驯化后,该铁甲各虫态体内游离氨基酸含量与对照存在显著差异($P<0.01$);经 12.5,15.0,17.5 和 20℃驯化后,该铁甲各虫态(2 龄幼虫除外)体内甘油含量与对照相比存在显著差异($P<0.01$);12.5, 15.0, 17.5 和 20℃驯化对除 2 龄幼虫、蛹和成虫外的铁甲其他各虫态体内可溶性糖原含量存在显著影响。经 15.0℃驯化处理后铁甲各虫态体内平均甘油含量最高,比对照 25℃的平均甘油含量高出约 9.4 倍,而经 12.5℃驯化处理的虫体内的平均甘油含量仅增加 3.5 倍。【结论】低温驯化对水椰八角铁甲体内相关生理活性物质含量的影响效能是有限的;水椰八角铁甲可以根据不良的环境条件调节最佳的生理状况,以适应未来的环境和达到最强的适应性。

关键词: 水椰八角铁甲; 低温驯化; 生理活性物质; 含水量; 蛋白质; 氨基酸; 脂肪; 甘油; 糖原

中图分类号: Q965　**文献标识码:** A　**文章编号:** 0454-6296(2014)03-0265-09

Changes in the contents of physiologically active substances in *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) after low temperature acclimation

HUA Rui-Xiang, HOU You-Ming*, SHI Zhang-Hong (Key Laboratory of Insect Ecology in Fujian; Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Fujian-Taiwan, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】The effect of low-temperature acclimation on the contents of related physiologically active substances was determined in *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae) to reveal its cold tolerance mechanisms.【Methods】We compared the contents of different physiological substances such as free water, protein, amino acids, crude fat, glycerol and soluble glycogen between the non-acclimation (25℃) and acclimation (acclimated at 12.5, 15.0, 17.5 and 20.0℃ for 10 d) treated *O. nipae*.【Results】The contents of related physiologically active substances in *O. nipae* were significantly affected by acclimation temperatures. With the decrease of the acclimation temperature, the contents of glycerol and amino acids increased, while those of the free water, protein, crude fat and glycogen decreased. Compared with the control, the contents of free water in *O. nipae* subjected to acclimation at 12.5℃ had significant changes ($P<0.01$). The contents of protein and crude fat significantly changed when *O. nipae* was subjected to low-temperature acclimation at 12.5, 15.0, 17.5 and 20.0℃, so did the content of the amino acids except under acclimation at 20℃ ($P<0.01$). Low temperature acclimation-mediated effects on glycerol content were found in *O. nipae* at different developmental stages except the 2nd instar larvae. Significant changes in the contents of soluble glycogen were determined in different developmental stages except the 2nd instar larvae, pupae and adults after being acclimated at 12.5, 15.0, 17.5 and

基金项目: 国家"973"计划项目(2009CB119206); 国家自然科学基金项目(31071749, 31272108)

作者简介: 华瑞香, 女, 1987 年生, 福建龙岩人, 硕士, 主要从事入侵生物学研究, E-mail: xiangxiang0645@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ymhou@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-05-17; 接受日期 Accepted: 2014-03-07

20℃, respectively. The average glycerol content in *O. nipae* after being acclimated at 15.0℃ was about 9.4 times higher than that at 25℃. However, after *O. nipae* was acclimated at 12.5℃, its average glycerol content increased only 3.5 times as compared with the control. 【Conclusion】These results indicated that the effect of low-temperature acclimation on the contents of related physiologically active substances in *O. nipae* was limited. *O. nipae* could make the optimal physiological adjustments based on the adverse environment conditions to adapt the future environment and maximize their fitness.

Key words: *Octodonta nipae*; low temperature acclimation; physiologically active substances; water content; protein; amino acids; fat; glycerol; glycogen

水椰八角铁甲 *Octodonta nipae*(Maulik)属鞘翅目(Coleoptera)叶甲科(Chrysomelidae),原产地为热带马来西亚,是棕榈科植物的重要检疫性害虫(孙江华等,2003; Hou and Weng, 2010)。其生活史包括卵、1-4龄幼虫、蛹、成虫,世代重叠严重,且聚集取食棕榈科植物,其危害程度仅次于椰心叶甲 *Brontispa longissima*(Gestro)(蔡卫群等,2007)。2001年,在我国海南省东方市的江南苗圃内的华盛顿棕榈 *Washingtonia filifera*(Linden *ex.* André) H. Wendl上首次发现该虫(梁琼超等,2005;李娟和胡学兵,2005)。除海南省外,水椰八角铁甲在广东、广西、云南和福建等省份均有发现危害(蔡卫群等,2007;Hou and Weng, 2010;侯有明等,2011)。

水椰八角铁甲主要以棕榈科观赏植物为取食寄主,而棕榈科植物在北方的园林绿化上也有广泛的种植,这为水椰八角铁甲向北扩散提供充足的食物资源。那么,该虫向北扩散的限制因素可能就是北方的气候条件,尤其是冬季或早春的低温。因此,了解水椰八角铁甲低温耐受能力与生理机制,将有助于预测其向北扩迁的可能性与潜力。

昆虫在遭受零度以下的温度时,常会采取一系列的行为和生理策略来保存生命,并且完成其生命周期(Danks, 2007; Bale and Hayward, 2010; Woodman, 2012)。已有的研究发现,驯化(acclimation)在昆虫的温度耐受性中发挥重要作用(Chown, 2001; Elderkin and Klerks, 2005; Klerks and Blaha, 2009; Mitchell and Hoffmann, 2010; Ma and Ma, 2012)。驯化指昆虫在经历一个胁迫温度之上的较温和的低温后其抵抗低温伤害能力增强的现象(王宪辉等,2003)。在自然环境中,最低温度来临之前的较低温和低温可以起到驯化的效果,驯化的响应可以是有益的、中性的或者消极的(Robbie and Craig, 2002;王宪辉等,2003;李晓晨和王立志,2005)。在这一过程中,昆虫通过调整体内相关物质含量和种类等生理适应机制来抵抗低温,且这种变化可能与过冷却点相关联(Zachariassen, 1985;孙绪艮等,2001)。一般而言,过冷却点愈低,抗寒力愈强,反之则弱。同时过冷却点的变化很大程度上取决于体液浓度的变化,在这个过程中,游离水、蛋白质、氨基酸、脂肪、小分子糖类物质等将起到重要作用(Lee and Denlinger, 1991;韩召军等,1989;王荫长,2000)。我们前期研究发现,低温驯化有助于提高水椰八角铁甲各虫态在更低温度下的存活率以及降低过冷却点(未发表)。

鉴于此,本文测定了低温驯化条件下水椰八角铁甲体内游离水、蛋白质、氨基酸、粗脂肪、甘油和可溶性糖原含量等耐寒性生理指标的变化,旨在明确低温对原产于热带的水椰八角铁甲的驯化效应,并揭示低温驯化降低其过冷却点且提高其低温存活率的生理机理,从而为预测该入侵害虫向北扩散的可能性及其综合管理措施等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和驯化处理

供试水椰八角铁甲采自福建省福清市(25.42°N, 119.23°E),在室内人工气候箱(PRX-250B,宁波海曙赛福实验仪器厂)中用加拿利海枣 *Phoenix canariensis* 心叶继代饲养,饲养条件为温度25±1℃,相对湿度85%±5%,光周期12L:12D。

1.2 生理活性物质的含量测定方法

水椰八角铁甲卵至蛹的发育起点温度为11.6±1.2℃(余凤玉等,2007)。根据这一结果我们选择低温驯化的上限为12.5±1℃。然后参考Woodman(2012)的低温驯化方法以及水椰八角铁甲的生活史特征,经预实验后确定4个驯化温度为20.0,17.5,15.0和12.5℃,以25.0℃为对照。具体操作如下:取水椰八角铁甲1,2,3和4龄幼虫,蛹和成虫(各15头)在人工气候箱(±1℃)中进行低温驯化和对照处理,饲喂加拿利海枣心叶,驯化10 d

后随机取样(各虫态取样 3 头)测定各虫态耐寒性生理指标的变化。每个驯化温度处理重复 3 次。

1.2.1　游离水含量测定：取不同温度驯化的 1，2，3 和 4 龄幼虫，蛹和成虫各 1.0 g 左右，分别用电子天平(AL104，梅勃特-托利多(上海)仪器有限公司)准确称重为 W_1(g)，然后放置在温度设置为 60℃的干燥箱(DHG-9033BSⅢ，上海新苗医疗器械制造有限公司)中烘干 24 h 至恒重，24 h 后称干重 W_2(g)。

游离水含量(%) = $(W_1 - W_2)/W_1 \times 100\%$。

1.2.2　粗脂肪含量测定：将不同驯化温度下的水椰八角铁甲各虫态于 60℃的干燥箱内烘干至恒重，然后研磨成虫粉，准确称重为 W_3(g，约 1.0 g)，随后用烘干脱脂滤纸包好上述虫粉，称重得 W_4(g)，然后放置于粗脂肪测定仪(SZF-06A，浙江托普仪器有限公司)中用 30～60℃沸程的石油醚抽提，12 h 后，将上述滤纸包放置于 60℃干燥箱内烘干 6 h 至恒重，称重得 W_5(g)。

粗脂肪含量(%) = $(W_4 - W_5)/W_3 \times 100\%$。

1.2.3　甘油含量测定：标准曲线的制作及甘油含量的测定方法均参照郭郛和忻介六(1988)报道的方法进行。其原理是在强碱溶液中甘油与新制氢氧化铜反应生成绛蓝色溶液，该溶液在 630 nm 处有一最大吸收峰。将脂肪测定中提取的各驯化温度下的水椰八角铁甲脂类提取液用石油醚定容处理。取 0.2 mL上述定容液注入 10 mL 试管内，于 60℃水浴，使其中的石油醚挥发完全，再加入 2 mL 浓硫酸，于沸水中消化。取上述消化液 0.4 mL 加入到事先制备的 $Cu(OH)_2$ (0.9 mL 10% $CuSO_4$ + 2.9 mL NaOH)悬浊液中，在离心机(5804R，Eppendorf)中以5 000 r/min 离心 10 min，在紫外分光光度计(WFZ-UV2000，尤尼科仪器有限公司)的 630 nm 波长下测吸光值，并计算甘油含量。

1.2.4　可溶性糖原含量测定：采用蒽酮法测定虫体内的可溶性糖原含量，标准曲线的制作及可溶性糖原含量测定的具体操作步骤参照王思忠(2006)报道的方法。其原理是在浓硫酸的作用下，糖可经脱水反应生成糖醛或羟甲基糖醛可与蒽酮反应生成蓝绿色糖醛衍生物，此有色物质在可见光区的 630 nm 处有一个显著的吸收峰值。将各驯化温度下的水椰八角铁甲各虫态放置在温度设置为 60℃的干燥箱中烘 24 h 至恒重后，取出，研磨成粉末备用，测定时每个样品称 0.1 g 左右虫粉，加 1 mL 30% KOH，沸水浴 30 min，待组织水解液成清澈透明并且无颗粒时取出。冷却后移入离心管，加入 3 mL 乙醇(95%)溶液。将离心管放置在冰箱(BCD-258WNN，青岛海尔股份有限公司)内过夜，次日离心(10 min，3 500 r/min)，舍弃上清液，将沉淀溶于 1 mL 的蒸馏水中，加入 4 mL 95% 乙醇溶液，在冰箱内放置 3～4 h，再次离心并弃上清液，沉淀用蒸馏水溶解，过滤，并定容于 25 mL 的容量瓶中。取各处理定容液 1 mL，放置于冰水混合物中冷却，再加入 5 mL 的蒽酮试剂，摇匀冷却，再置于沸水浴中 15 min，取出后迅速放于暗处的冰水浴中静置 20～30 min，然后在波长为 630 nm 进行比色，测得吸光度值并根据标准曲线查出样品溶液中葡萄糖的含量，将测得的葡萄糖含量数值乘以 0.927，即得各虫态体内可溶性糖原含量。

1.2.5　游离蛋白质含量测定：采用考马斯亮蓝 G-250 法测定虫体内的游离蛋白质含量。标准曲线的制作方法如王学奎(2010)所述。其反应原理是考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合产生蓝色反应，蛋白质-色素结合物的最大光吸收波长为 595 nm。取各驯化温度下的各龄期水椰八角铁甲 0.05 g 左右，加 1 mL 0.04 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)匀浆，匀浆后转移到离心管中，用 6 mL 0.04 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)冲洗均浆器，匀浆液在 20～25℃放置 4 h 以上充分抽提，在 6 000 r/min 离心 10 min，上清液移入 10 mL 容量瓶中，用 0.04 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)定容。取 0.2 mL 定容液，加入 0.8 mL 0.04 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)及 5.0 mL 考马斯亮蓝纵向倒转混合，放置 2 min，于 595 nm 波长比色，计算各游离蛋白质含量。

1.2.6　游离氨基酸含量测定：采用茚三酮试剂显色法测定虫体内游离氨基酸含量，标准曲线的制作及样品测定参照王学奎(2010)描述的方法。其原理是游离氨基酸与茚三酮共热时，能定量地生成二酮茚-二酮茚胺，该产物显示蓝紫色，其吸收峰为 570 nm。取各驯化温度下的的各虫态约 0.05 g，于匀浆器中加入 0.5 mL 的 10% 乙酸，匀浆液转移到 10 mL 的离心管中，并用 7 mL 的蒸馏水冲洗匀浆器，冲洗液一并转移到离心管中。混匀，并于 20℃ 6 000 r/min离心 10 min。离心后弃沉淀，上清液定容至 10 mL。吸取上述定容液 1.0 mL，放入 20 mL 干燥的带塞试管中，在加入无氨蒸馏水 1.0 mL 后，加入 0.1 mL 0.1% 抗坏血酸和3.0 mL水合茚三酮试剂，按照标准曲线制作步骤显色、比色，并查询标准曲线，计算样品中的游离氨基酸含量。

1.3 数据分析

数据分析运用统计分析软件 SPSS17.0，计算出游离水、粗脂肪、甘油、可溶性糖原、游离蛋白质、游离氨基酸的平均含量。采用方差分析（ANOVA），结合最小显著差数法（LSD），进行多重比较分析不同驯化温度对水椰八角铁甲各虫态体内的游离水、粗脂肪、甘油、可溶性糖原、游离蛋白质、游离氨基酸含量的影响，显著性检验水平为 $P = 0.05$。

2 结果与分析

2.1 低温驯化对水椰八角铁甲各虫态游离水含量的影响

从表 1 可以看出，水椰八角铁甲幼虫、蛹和成虫体内的游离水含量均随着驯化温度的降低而下降，除 2 龄幼虫外，低温驯化显著降低该铁甲其他虫态体内的游离水含量（1 龄幼虫：$F_{4,10} = 3.64$，$P = 0.04$；2 龄幼虫：$F_{4,10} = 2.87$，$P = 0.08$；3 龄幼虫：$F_{4,10} = 5.73$，$P < 0.01$；4 龄幼虫：$F_{4,10} = 41.79$，$P < 0.01$；蛹：$F_{4,10} = 4.59$，$P = 0.02$；成虫：$F_{4,10} = 16.50$，$P < 0.01$）。12.5℃ 驯化处理与对照组铁甲各虫态体内的游离水含量存在显著差异，例如 3 龄幼虫是铁甲生长最迅速的一个虫态，经 12.5℃ 驯化后，其游离水含量比对照下降 10%。

2.2 低温驯化对水椰八角铁甲各虫态体内蛋白质含量的影响

随着驯化温度的降低，水椰八角铁甲各虫态体内蛋白质含量均呈显著下降趋势（1 龄幼虫：$F_{4,10} = 2\,561.68$，$P < 0.01$；2 龄幼虫：$F_{4,10} = 328.28$，$P < 0.01$；3 龄幼虫：$F_{4,10} = 1\,222.49$，$P < 0.01$；4 龄幼虫：$F_{4,10} = 119.37$，$P < 0.01$；蛹：$F_{4,10} = 325.87$，$P < 0.01$；成虫：$F_{4,10} = 341.98$，$P < 0.01$）。经 12.5℃ 驯化后虫体内蛋白质含量最低，而对照组虫体内的含量最高（表 2）。12.5℃ 驯化的 4 龄幼虫体内蛋白质含量仅为 1.36% ± 0.03%，而对照组虫体内蛋白质含量为 4.37% ± 0.02%，前者相比后者而言，其蛋白质含量下降了 69%。

表 1 低温驯化对水椰八角铁甲游离水含量的影响

Table 1 Effect of low temperature acclimation on free water content in *Octodonta nipae*

发育阶段 Developmental stage	游离水含量 Free water content (%)				
	12.5℃	15℃	17.5℃	20℃	25℃ (CK)
1 龄幼虫 1st instar larva	73.16 ± 1.47 a	74.90 ± 0.37 ab	75.59 ± 0.33 abc	77.04 ± 0.16 bc	78.70 ± 0.19 c
2 龄幼虫 2nd instar larva	73.60 ± 1.51 a	74.77 ± 0.08 ab	75.83 ± 0.30 ab	76.84 ± 0.67 ab	78.11 ± 1.59 b
3 龄幼虫 3rd instar larva	71.23 ± 0.16 a	72.49 ± 0.53 a	73.90 ± 0.67 a	75.35 ± 1.46 ab	79.17 ± 2.30 b
4 龄幼虫 4th instar larva	72.80 ± 0.83 a	72.92 ± 0.06 a	74.29 ± 0.64 b	75.61 ± 0.23 c	77.56 ± 0.03 d
蛹 Pupa	68.51 ± 0.24 a	70.09 ± 0.29 ab	70.71 ± 0.34 b	71.60 ± 0.02 b	71.95 ± 0.13 b
成虫 Adult	52.15 ± 0.04 a	52.58 ± 0.03 a	53.49 ± 0.82 ab	54.61 ± 0.43 b	56.31 ± 0.02 c

表中数据为平均值 ± 标准误；表中同一行数据后不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$，最小显著差数法 LSD）；下同。Data are mean ± *SE*, different lowercase letters following the data in a row indicate significant difference at the 0.05 level ($P < 0.05$, LSD). The same for the following tables.

表 2 低温驯化对水椰八角铁甲体内蛋白质含量的影响

Table 2 Effect of low temperature acclimation on the protein content in *Octodonta nipae*

发育阶段 Developmental stage	蛋白质含量 Protein content (%)				
	12.5℃	15℃	17.5℃	20℃	25℃ (CK)
1 龄幼虫 1st instar larva	1.34 ± 0.02 a	2.38 ± 0.03 b	3.77 ± 0.03 c	3.81 ± 0.04 c	5.63 ± 0.03 d
2 龄幼虫 2nd instar larva	1.40 ± 0.08 a	2.31 ± 0.05 b	3.59 ± 0.05 c	3.71 ± 0.15 c	5.34 ± 0.01 d
3 龄幼虫 3rd instar larva	1.29 ± 0.01 a	2.11 ± 0.05 b	2.73 ± 0.05 c	3.78 ± 0.03 d	4.39 ± 0.01 e
4 龄幼虫 4th instar larva	1.36 ± 0.03 a	2.30 ± 0.02 b	3.51 ± 0.21 c	3.75 ± 0.12 c	4.37 ± 0.02 d
蛹 Pupa	1.59 ± 0.03 a	2.32 ± 0.05 b	4.30 ± 0.15 c	4.93 ± 0.15 d	5.93 ± 0.03 e
成虫 Adult	1.24 ± 0.01 a	2.61 ± 0.07 b	4.03 ± 0.04 c	4.43 ± 0.23 d	6.69 ± 0.04 e

2.3 低温驯化对水椰八角铁甲各虫态游离氨基酸含量的影响

不同驯化处理对水椰八角铁甲各虫态体内的游离氨基酸含量的影响表明（表 3），随着驯化温度的降低游离氨基酸含量均升高。除 20℃ 驯化处理外，经各驯化温度处理的游离氨基酸含量与对照相比存在极显著差异（1 龄幼虫：$F_{4,10} = 21.27$，$P < 0.01$；2 龄幼虫：$F_{4,10} = 72.90$，$P < 0.01$；3 龄幼虫：$F_{4,10} = 17.12$，$P < 0.01$；4 龄幼虫：$F_{4,10} = 14.49$，$P < 0.01$；蛹：$F_{4,10} = 51.81$，$P < 0.01$；成虫：$F_{4,10} = 10.64$，$P < 0.01$）。

12.5℃驯化后的 2 龄幼虫体内的游离氨基酸含量为 0.23%，显著高于 25℃对照的 2 龄幼虫体内的游离氨基酸含量 0.13%。

2.4　低温驯化对水椰八角铁甲各虫态体内粗脂肪含量的影响

从表 4 可以看出，随着驯化温度的下降，水椰八角铁甲各虫态体内的粗脂肪含量均极显著降低（1 龄幼虫：$F_{4,10}=38.20$，$P<0.01$；2 龄幼虫：$F_{4,10}=59.76$，$P<0.01$；3 龄幼虫：$F_{4,10}=200.70$，$P<0.01$；4 龄幼虫：$F_{4,10}=14.48$，$P<0.01$；蛹：$F_{4,10}=381.16$，$P<0.01$；成虫：$F_{4,10}=146.35$，$P<0.01$）。经 12.5℃驯化后的铁甲蛹中的粗脂肪含量为 3.71% ±0.02%，而对照组蛹中的粗脂肪含量为 7.13% ±0.11%，含量下降 48%。

表 3　低温驯化对水椰八角铁甲游离氨基酸含量的影响

Table 3　Effect of low temperature acclimation on the content of free amino acids in *Octodonta nipae*

发育阶段 Developmental stage	游离氨基酸含量 Content of free amino acids (%)				
	12.5℃	15℃	17.5℃	20℃	25℃ (CK)
1 龄幼虫 1st instar larva	0.17 ±0.00 d	0.15 ±0.00 c	0.14 ±0.01 bc	0.13 ±0.00 ab	0.12 ±0.00 a
2 龄幼虫 2nd instar larva	0.23 ±0.00 c	0.16 ±0.00 b	0.16 ±0.00 b	0.14 ±0.01 a	0.13 ±0.01 a
3 龄幼虫 3rd instar larva	0.18 ±0.00 c	0.17 ±0.00 c	0.15 ±0.01 b	0.15 ±0.00 b	0.13 ±0.00 a
4 龄幼虫 4th instar larva	0.19 ±0.00 d	0.17 ±0.00 cd	0.17 ±0.00 bc	0.15 ±0.01 ab	0.14 ±0.01 a
蛹 Pupa	0.21 ±0.00 c	0.16 ±0.00 b	0.15 ±0.00 b	0.15 ±0.00 b	0.13 ±0.01 a
成虫 Adult	0.16 ±0.00 d	0.15 ±0.00 cd	0.14 ±0.00 bc	0.14 ±0.00 ab	0.13 ±0.00 a

表 4　低温驯化对水椰八角铁甲体内粗脂肪含量的影响

Table 4　Effect of low temperature acclimation on crude fat content in *Octodonta nipae*

发育阶段 Developmental stage	粗脂肪含量 Crude fat content (%)				
	12.5℃	15℃	17.5℃	20℃	25℃ (CK)
1 龄幼虫 1st instar larva	2.74 ±0.17 a	2.84 ±0.05 a	2.91 ±0.06 a	3.35 ±0.11 b	4.34 ±0.03 c
2 龄幼虫 2nd instar larva	2.88 ±0.12 a	3.32 ±0.09 b	4.18 ±0.12 c	4.47 ±0.19 c	5.20 ±0.02 d
3 龄幼虫 3rd instar larva	3.51 ±0.06 a	4.15 ±0.07 b	4.92 ±0.08 c	5.13 ±0.08 d	5.89 ±0.03 e
4 龄幼虫 4th instar larva	3.81 ±0.14 a	4.51 ±0.11 b	4.63 ±0.09 b	5.38 ±0.40 c	5.74 ±0.04 c
蛹 Pupa	3.71 ±0.02 a	4.58 ±0.06 b	4.96 ±0.05 c	5.12 ±0.05 c	7.13 ±0.11 d
成虫 Adult	4.35 ±0.14 a	5.03 ±0.12 b	5.25 ±0.05 b	7.01 ±0.35 c	9.76 ±0.07 d

2.5　低温驯化对水椰八角铁甲各虫态甘油含量的影响

随着驯化温度的降低，水椰八角铁甲各虫态体内的甘油含量升高，差异达极显著水平（1 龄幼虫：$F_{4,10}=914.42$，$P<0.01$；2 龄幼虫：$F_{4,10}=8.10$，$P<0.01$；3 龄幼虫：$F_{4,10}=451.13$，$P<0.01$；4 龄幼虫：$F_{4,10}=403.19$，$P<0.01$；蛹：$F_{4,10}=2\,931.25$，$P<0.01$；成虫：$F_{4,10}=299.48$，$P<0.01$）。12.5℃驯化处理的各虫态体内的甘油含量没有达到最高水平，而经 15℃或 17.5℃驯化后的试虫体内的甘油含量最高（表 5）。与对照相比，所有驯化处理均显著提高该铁甲各虫态（2 龄幼虫除外）体内的甘油含量；而在 2 龄幼虫中，只有经 15℃和 20℃驯化处理的试虫体内的甘油含量与对照组试虫体内的甘油含量存在显著差异。与 25℃对照相比，15℃驯化处理的铁甲 1，2，3 和 4 龄幼虫体内的甘油含量分别增加了 18.5，5.4，3.3 和 3.2 倍；蛹的增加了 13.3 倍；成虫的增加了 12.8 倍；17.5℃驯化处理的铁甲 4 龄幼虫体内的甘油含量增加了 4.8 倍。总体而言，经 15.0℃驯化处理后铁甲各虫态体内平均甘油含量最高，比对照 25℃的平均甘油含量高出约 9.4 倍，而经 12.5℃驯化处理的虫体内的平均甘油含量仅增加 3.5 倍。

2.6　低温驯化对水椰八角铁甲各虫态可溶性糖原含量的影响

随着驯化温度降低，水椰八角铁甲各虫态体内的可溶性糖原含量显著降低（1 龄幼虫：$F_{4,10}=57.40$，$P<0.01$；2 龄幼虫：$F_{4,10}=16.44$，$P<0.01$；3 龄幼虫：$F_{4,10}=775.97$，$P<0.01$；4 龄幼虫：$F_{4,10}=117.89$，$P<0.01$；蛹：$F_{4,10}=675.87$，$P<0.01$；成虫：$F_{4,10}=4.42$，$P=0.03$）。除 2 龄幼虫、蛹、成虫外，各驯化温度处理的水椰八角铁甲各虫态体内的可溶性糖原含量与对照相比存在显著差异。4 龄幼虫中，经 12.5℃驯化后，其体内的可溶性糖原含量为 0.50% ±0.01%，而对照组的糖原含量为 2.66% ±0.06%。

表 5 低温驯化对水椰八角铁甲甘油含量的影响

Table 5 Effect of low temperature acclimation on glycerol content in *Octodonta nipae*

发育阶段 Developmental stage	甘油含量 Glycerol content (%)				
	12.5℃	15℃	17.5℃	20℃	25℃ (CK)
1 龄幼虫 1st instar larva	0.15 ± 0.00 c	0.39 ± 0.01 e	0.13 ± 0.00 b	0.24 ± 0.01 d	0.02 ± 0.00 a
2 龄幼虫 2nd instar larva	0.11 ± 0.00 a	0.32 ± 0.07 c	0.13 ± 0.00 ab	0.24 ± 0.05 bc	0.05 ± 0.00 a
3 龄幼虫 3rd instar larva	0.19 ± 0.00 b	0.30 ± 0.01 c	0.20 ± 0.01 b	0.29 ± 0.00 c	0.07 ± 0.00 a
4 龄幼虫 4th instar larva	0.21 ± 0.00 b	0.25 ± 0.00 c	0.35 ± 0.01 d	0.22 ± 0.01 b	0.06 ± 0.00 a
蛹 Pupa	0.11 ± 0.00 b	0.43 ± 0.00 e	0.13 ± 0.00 c	0.28 ± 0.00 d	0.03 ± 0.00 a
成虫 Adult	0.37 ± 0.01 c	0.69 ± 0.03 d	0.29 ± 0.00 b	0.33 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 a

表 6 低温驯化对水椰八角铁甲可溶性糖原含量的影响

Table 6 Effect of low temperature acclimation on soluble glycogen content in *Octodonta nipae*

发育阶段 Developmental stage	可溶性糖原 Soluble glycogen content (%)				
	12.5℃	15℃	17.5℃	20℃	25℃ (CK)
1 龄幼虫 1st instar larva	0.17 ± 0.00 a	0.61 ± 0.07 b	0.62 ± 0.02 b	0.74 ± 0.04 b	1.06 ± 0.04 c
2 龄幼虫 2nd instar larva	0.63 ± 0.01 a	0.78 ± 0.04 ab	0.87 ± 0.10 b	1.20 ± 0.07 c	1.35 ± 0.11 c
3 龄幼虫 3rd instar larva	0.32 ± 0.01 a	0.89 ± 0.01 b	1.17 ± 0.02 b	0.89 ± 0.01 b	1.86 ± 0.03 d
4 龄幼虫 4th instar larva	0.50 ± 0.01 a	1.07 ± 0.03 b	1.46 ± 0.11 b	1.51 ± 0.15 c	2.66 ± 0.06 d
蛹 Pupa	0.67 ± 0.03 a	0.72 ± 0.04 b	1.13 ± 0.02 c	1.82 ± 0.00 d	1.92 ± 0.01 d
成虫 Adult	0.27 ± 0.00 a	0.61 ± 0.10 ab	0.82 ± 0.02 abc	0.94 ± 0.01 bc	1.36 ± 0.42 c

3 讨论

本文研究发现，水椰八角铁甲体内游离水分含量随着驯化温度的降低而降低。韩瑞东等（2005）对赤松毛虫 *Dendrolimus spectabilis* 的研究也取得了相似的结果，赤松毛虫在越冬过程中体内的游离水含量从 10 月份的 76.0% 下降到了 1 月份的 62.3%。另外赵静等（2008）的研究也发现异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 体内的含水量随着气温的降低而降低。昆虫体内水分含量的降低是由于自由水排出或者转化为结合水，而使其体液浓度增高（鞠瑞亭和杜予州，2002）。同时，也有研究表明具有较高含水量的物种一般都比较容易受到低温伤害。因此，生物体在驯化过程中会采取移除肠道物（如粪便）和脱水去除冰核来降低低温结冰伤害（Krunić and Radović, 1974; Holmstrup and Somme, 1998; Woodman, 2012）。另外，韩召军等（1989）研究表明耐寒性昆虫在冷适应过程中，体内含水量会大大降低，许多昆虫在越冬过程中体内含水量几乎下降到致死临界点，这种变化有利于昆虫过冷却点的降低，从而有利于昆虫的耐寒或者越冬。

低温驯化后水椰八角铁甲体内蛋白质含量降低，且不同温度驯化的效果不同。与松阿扁叶蜂 *Acantholyda posticalis* 从越冬期间的 10 月到第 2 年的 2 月的体内蛋白质含量下降的研究结论一致（梁中贵等，2005）。昆虫进入越冬期后，幼虫为适应外界低温变化，将体内的蛋白质转化为其他抗寒物质或转移到血淋巴中增强其抗寒能力（梁中贵等，2005）。另外，越冬昆虫体内蛋白质含量的降低与缺乏营养物质吸取有关（王鹏等，2011）。因此，经低温驯化处理后，水椰八角铁甲体内蛋白质含量下降可能是由于低温驯化影响了水椰八角铁甲的取食，同时体内的蛋白质作为能量物质被利用。或者由于蛋白质转换为其他物质以增强自身的防护能力及降低过冷却点来调控其耐寒性，从而使种群避免低温的严重伤害。

甘油是最普遍的耐寒性物质，并且是越冬昆虫存活的关键物质（Han and Bauce, 1995）。低温能导致甘油含量在血淋巴中增加，甘油可以作为防冻剂以防止冰晶形成而造成不可逆的细胞损伤（Lee and Denlinger, 1991; Bale, 2002; Elnitsky *et al.*, 2008; Atapour and Moharramipour, 2009; Denlinger and Lee, 2010; Woodman, 2012）。在本研究中，我们发现不同温度的驯化处理对水椰八角铁甲各虫态体内的甘油含量影响显著。在对照 25℃ 中，水椰八角铁甲各虫态体内的平均甘油含量仅为 0.05%，经 15℃ 驯化处理后，铁甲各虫态体内的平均甘油含量可达 0.40%，比对照增长 7 倍。这一数据表明水椰八角铁甲各虫态为适应不同低温胁迫，在抵御寒冷过程中产生更多的甘油。这与以前关于云杉蚜卷蛾 *Choristoneura fumiferana* 的报道结果相似：当滞育云

杉蚜卷蛾被暴露到更低温度（-5℃）时，甘油含量大幅增加（Han and Bauce，1995）。这些结果表明昆虫能响应温度变化：一定温度范围内，温度越低，滞育幼虫将产生更多甘油。但在本研究结果中更低的驯化温度——12.5℃驯化后铁甲各虫态体内的平均甘油含量仅为0.19%，含量显著低于经15℃驯化处理后铁甲各虫态体内的平均甘油含量。这可能是因为甘油水平的上升幅度和模式与低温驯化的强度及时间相关。驯化温度12.5℃与水椰八角铁甲卵至蛹的发育起点温度11.6±1.2℃（余凤玉等，2007）接近，并且驯化时间为10 d，如果投资更多的成本到甘油合成上，可能将会对其存活造成影响；或者在这极端的生存环境中，存在合成代价问题，或者其他适应性策略的取舍，例如在生存策略与繁殖策略的取舍中选择后者（Andrew *et al.*，2011）。但关于这一现象的确切解释还有待进一步实验验证。

水椰八角铁甲粗脂肪含量随着驯化温度上升而上升，不同低温驯化处理的影响程度不同。这类似于该铁甲体内蛋白质含量对不同驯化温度的响应。如成虫体内的粗脂肪含量从12.5℃的4.35%上升到对照25℃的9.76%，表明水椰八角铁甲不以脂肪作为体内抗寒物质而存储积累。王荫长（2000）指出，在昆虫的越冬期游离脂肪一部分转化为结合脂肪，用作抗寒物质而积累；另外也有研究表明开心果果螟 *Arimania comaroffi* 蛹的脂肪在越冬期间降低并且在3月末达到最低水平（Bemani *et al.*，2012）。本研究中，虽无文献可查证水椰八角铁甲是否具有越冬虫态，但低温驯化处理后其脂肪含量的变化也显示相似的趋势。

游离氨基酸在昆虫中能起调节血淋巴渗透压的作用，而昆虫渗透压与过冷却点有显著相关性，说明昆虫体内的游离氨基酸含量与抗寒性之间存在相关关系。韩瑞东等（2005）研究表明苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸、胱氨酸在赤松毛虫 *Dendrolimus spectabilis* 幼虫越冬期间含量增幅较大，是赤松毛虫越冬幼虫的重要抗寒物质。在本研究中，不同驯化温度对水椰八角铁甲体内游离氨基酸含量的影响程度不同，经更低的驯化温度处理后，该铁甲体内的游离氨基酸含量更高。虽然没有鉴定增加的氨基酸种类，但从总体上发现游离氨基酸含量在更低的驯化温度下显著增高，这种增长的趋势与前人的研究结果一致。对于在低温驯化中游离氨基酸含量增加的途径则可能是由于蛋白质分解或者脂肪体内的氨基酸释放到血淋巴中（韩瑞东等，2005）。

糖类是昆虫生命活动的重要能源物质及中间代谢产物，与昆虫滞育的发生、维持和终止有密切关系。在滞育过程中，麦红吸浆虫 *Sitodiplosis mosellana* 体内的总糖含量明显下降（仵均祥等，2004）。在低温下，糖原含量随着环境温度下降而下降（Bemani *et al.*，2012）。另外有研究报道，在昆虫滞育开始时，糖原转化为山梨醇和甘油，并在滞育期间保持较高的水平，当滞育终止时，依赖性的山梨醇脱氢酶——NAD活性提高，山梨醇和甘油又被重新转化为糖原而提供能源（Yaginuma and Yamashita，1979；Niimi and Yaginuma，1992）。在本研究中，低温驯化对水椰八角铁甲体内的可溶性糖原含量影响显著，并且随着驯化温度的上升，其体内的可溶性糖原含量上升。对照组铁甲体内的平均可溶性糖原含量达到最大水平，为1.7%，而经12.5℃驯化后的铁甲各虫态体内的平均可溶性糖原仅为0.4%。该结果表明，虽然水椰八角铁甲危害的是热带作物，无文献可查证其是否具有滞育虫态或者滞育期，但在应对较低温度驯化时产生了响应，这一响应可能与其适应性变化有很大关系。

综上所述，本文研究发现低温驯化能够明显地影响水椰八角铁甲体内的相关生理活性物质的含量。因此，水椰八角铁甲可能通过调节自身的生理活性物质含量水平以降低过冷却点，提高耐寒能力以适应低温胁迫，从而获得更高的存活率。这种生理策略可能在水椰八角铁甲向北入侵扩散的过程中扮演重要角色。

参考文献（References）

Andrew NR, Hart RA, Terblanche JS, 2011. Limited plasticity of low temperature tolerance in an Australian cantharid beetle *Chauliognathus lugubris*. *Physiological Entomology*, 36(4): 385-391.

Atapour M, Moharramipour S, 2009. Changes of cold hardiness, supercooling capacity, and major cryoprotectants in overwintering larvae of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*, 38(1): 260-265.

Bale JS, 2002. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357: 849-862.

Bale JS, Hayward SAL, 2010. Insect overwintering in a changing climate. *Experimental Biology*, 213: 980-994.

Bemani M, Izadi H, Mahdian K, Khani A, Amin samih M, 2012. Study on the physiology of diapause, cold hardiness and supercooling point of overwintering pupae of the pistachio fruit hull borer, *Arimania comaroffi*. *Journal of Insect Physiology*, 58(7): 897-902.

Cai WQ, Wang Z, Deng JY, 2007. The risk of pests and diseases in the

status quo and prevention strategies of palm plants in Guangdong province. *Hunan Forestry Science and Technology*, 34(3): 48－50. [蔡卫群, 王忠, 邓洁英, 2007. 广东省棕榈科植物危险性病虫害发生现状与防治策略. 湖南林业科技, 34(3): 48－50]

Chown SL, 2001. Physiological variation in insects: hierarchical levels and implications. *Journal of Insect Physiology*, 47(7): 649－660.

Danks HV, 2007. The elements of seasonal adaptations in insects. *Canadian Entomologist*, 139: 1－44.

Denlinger DL, Lee RE, 2010. Low Temperature Biology of Insects. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Elderkin CL, Klerks PL, 2005. Variation in thermal tolerance among three Mississippi river populations of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Shellfish Research*, 24(1): 221－226.

Elnitsky MA, Hayward SAL, Rinehart JP, Denlinger DL, Lee RE, 2008. Cryoprotective dehydration and the resistance to inoculative freezing in the Antarctic midge, *Belgica antartica*. *Experimental Biology*, 211: 524－530.

Guo F, Xin JL, 1988. Entomological Experimental Technology. Science Press, Beijing. 165－195. [郭郛, 忻介六, 1988. 昆虫学实验技术. 北京: 科学出版社. 165－195]

Han EN, Bauce E, 1995. Glycerol synthesis by diapausing larvae in response to the timing of low temperature exposure, and implications for overwintering survival of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Insect Physiology*, 41(11): 981－985.

Han RD, Sun XG, Xu YY, Zhang WG, 2005. The biochemical mechanism of cold-hardiness in overwintering larva of *Dendrolimus spectabilis* Butler (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Acta Ecologica Sinica*, 25(6): 1352－1356. [韩瑞东, 孙绪艮, 许永玉, 张卫光, 2005. 赤松毛虫越冬幼虫生化物质变化与抗寒性的关系. 生态学报, 25(6): 1352－1356]

Han ZJ, Wang YC, You ZP, 1989. Cold-endurance mechanism of terrestrial insects. *Entomological Knowledge*, 26(1): 39－42. [韩召军, 王荫长, 尤子平, 1989. 陆生昆虫的抗寒性机制. 昆虫知识, 26(1): 39－42]

Holmstrup M, Somme L, 1998. Dehydration and cold hardiness in the arctic collembolan *Onychiurus arcticus* Tullberg 1876. *Comparative Physiology Part B*, 168: 197－203.

Hou YM, Weng ZQ, 2010. Temperature-dependent development and life table parameters of *Octodonta nipae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 39(5): 1676－1684.

Hou YM, Wu ZJ, Wang CF, 2011. The status and harm of biological invasion in Fujian, China. In: Xie LH, You MS, Hou YM eds. Biological Invasions: Problems and Countermeasures. Science Press, Beijing. 111－114. [侯有明, 吴祖建, 王长方, 2011. 福建生物入侵现状与危害. 见: 谢联辉, 尤民生, 侯有明 编著. 生物入侵: 问题与对策. 北京: 科学出版社. 111－114]

Ju RT, Du YZ, 2002. Mensuration of super-cooling point and principles of cold hardiness of insects. *Wuyi Science Journal*, 18: 252－257. [鞠瑞亭, 杜予州, 2002. 昆虫过冷却点的测定及抗寒机制研究概述. 武夷科学, 18: 252－257]

Klerks PL, Blaha MA, 2009. Heat tolerance as an indicator of climate change impacts: general considerations and a case study in poeciliid fish. *Environmental Bioindicators*, 4(1): 46－66.

Krunić MD, Radović IT, 1974. The effect of gut-content evacuation on the increase of cold-hardiness in *Megachile rotundata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 17: 526－528.

Lee RE, Denlinger DL, 1991. Insects at Low Temperature. Chapman & Hall, New York.

Li J, Hu XB, 2005. China's major forestry exotic pest species descriptions (Ⅰ). *Forest Pest and Disease*, 24(2): 38－40. [李娟, 胡学兵, 2005. 我国主要林业外来有害生物种类简述(Ⅰ). 中国森林病虫, 24(2): 38－40]

Li XC, Wang LZ, 2005. Effects of temperature and thermal acclimation on locomotor performance of *Macrobiotus hufelandi* Schultze (Tardigrada: Macrobiotidae). *Acta Zoologica Sinica*, 51(3): 516－520. [李晓晨, 王立志, 2005. 温度和热驯化对胡氏大生熊虫运动行为的影响. 动物学报, 51(3): 516－520]

Liang QC, Huang FY, Lai TZ, Xu BD, Li ZW, Chen SY, 2005. Intercepted dangerous pests *Octodonta nipae* from immigrated Thailand seedlings. *Plant Quarantine*, (3): 160－161. [梁琼超, 黄法余, 赖天忠, 徐北大, 李志伟, 陈升毅, 2005. 从入境泰国种苗截获的危险性害虫水椰八角铁甲. 植物检疫, (3): 160－161]

Liang ZG, Zhang WG, Liu XH, Meng QY, Sun XG, 2005. Cold-hardiness analysis of over-wintering larva of *Acantholyda posticalis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(6): 695－699. [梁中贵, 张卫光, 刘学辉, 孟庆英, 孙绪艮, 2005. 松阿扁叶蜂越冬幼虫体内抗寒物质分析. 昆虫知识, 42(6): 695－699]

Ma G, Ma CS, 2012. Climate warming may increase aphids' dropping probabilities in response to high temperatures. *Journal of Insect Physiology*, 58(11): 1456－1462.

Mitchell KA, Hoffmann AA, 2010. Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*. *Functional Ecology*, 24(3): 694－700.

Niimi T, Yaginuma T, 1992. Biosynthesis of NAD-sorbitol dehydrogenase is induced by acclimation at 5℃ in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 102 (1): 169－173.

Robbie SW, Craig EF, 2002. Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(2): 66－70.

Sun JH, Yu PY, Zhang YZ, Wang XJ, 2003. A new invasive coconut pest in Hainan Province. *Entomological Knowledge*, 40(3): 286－287. [孙江华, 虞佩玉, 张彦周, 王小君, 2003. 海南省新发现的林业外来入侵害虫——水椰八角铁甲. 昆虫知识, 40(3): 286－287]

Sun XG, Wang XH, Li ST, 2001. The cold tolerance mechanism of insects and its research development. *Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 32(3): 393－396. [孙绪艮, 王兴华, 李恕廷, 2001. 昆虫耐寒性机制及其研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版), 32(3): 393－396]

Wang P, Ling F, Yu Y, Zhang AS, Men XY, Li LL, Xu YY, 2011. The dynamics of super-cooling ability and biochemical substances in the overwintering *Carposina niponensi* Walsingham (Lepidoptera: Carposinidae) larvae. *Acta Ecologica Sinica*, 31(3): 638－645.

［王鹏，凌飞，于毅，张安盛，门兴元，李丽莉，许永玉，2011. 桃小食心虫越冬幼虫过冷却能力及体内生化物质动态. 生态学报，31(3)：638－645］

Wang SZ，2006. Study on the Biological Characteristics and Cold-hardiness of *Locusta migratoria tibetensis*. MSc Thesis，Sichuan Agricultural University，Ya'an，Sichuan. 30－31.［王思忠，2006. 西藏飞蝗生物学特性及耐寒性研究. 四川雅安：四川农业大学硕士学位论文. 30－31］

Wang XH，Qi XL，Kang L，2003. Cold hardening phenomenon and its ecological adaptation in insects. *Progress in Natural Science*，13(11)：1128－1133.［王宪辉，齐宪磊，康乐，2003. 昆虫的快速冷驯化现象及其生态适应意义. 自然科学进展，13(11)：1128－1133］

Wang XK，2010. Plant Physiology and Biochemistry Experimental Principle and Technology. 2nd ed. Higher Education Press，Beijing. 199－201.［王学奎，2010. 植物生理生化实验原理和技术(第 2 版). 北京：高等教育出版社. 199－201］

Wang YC，2000. Insect Biochemistry. China Agriculture Press，Beijing. 57－60.［王荫长，2000. 昆虫生物化学. 北京：中国农业出版社. 57－60］

Woodman JD，2012. Cold tolerance of the Australian spur-throated locust，*Austracris guttulosa*. *Journal of Insect Physiology*，58(3)：384－390.

Wu JX，Yuan F，Su L，2004. Change of carbohydrate contents in larvae of the wheat midge，*Sitodiplosis mosellana* (Gehin) during mature and diapause stage. *Acta Entomologica Sinica*，47(2)：178－183.［仵均祥，袁锋，苏丽，2004. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化. 昆虫学报，47(2)：178－183］

Yaginuma T，Yamashita O，1979. Dependent sorbitol dehydrogenase activity in relation to the termination of diapause in eggs of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*，9：547－553.

Yu FY，Ma ZL，Li CX，Huang SC，Li HS，Zhou HQ，Han CW，Qin WQ，2007. Effects of temperature on the development of *Octodonta nipae* (Maulik). *Entomological Journal of East China*，16(4)：264－267.［余凤玉，马子龙，李朝绪，黄山春，李和帅，周焕起，韩超文，覃伟权，2007. 温度对水椰八角铁甲生长发育的影响. 华东昆虫学报，16(4)：264－267］

Zachariassen KE，1985. Physiology of cold tolerance in insect. *Physiological Reviews*，65(4)：977－832.

Zhao J，Yu LY，Li M，Zheng FQ，Zhang F，Xu YY，2008. Seasonal variation in cold tolerance of the multicolored ladybeetle，*Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera：Coccinellidae) adults. *Acta Entomologica Sinica*，51(12)：1271－1278.［赵静，于令媛，李敏，郑方强，张帆，许永玉，2008. 异色瓢虫成虫耐寒能力的季节性变化研究. 昆虫学报，51(12)：1271－1278］

（责任编辑：赵利辉）